Istituto d'igiene della R. Università di Cagliari

RICERCHE SULLA TOSSINA DEL B. DI EBERTH

DEL DOTTOR GIUSEPPE FRAU

Catania Tip. dell' Etna

Istituto d'igiene della R. Università di Cagliari

RICERCHE SULLA TOSSINA DEL B. DI EBERTH

DEL DOTTOR GIUSEPPE FRAU

Catania Tip. dell' Etna

Istituto d'igiene della R. Università di Cagliari

RICERCHE SULLA TOSSINA DEL B. DI EBERTH

DEL DOTTOR GIUSEPPE FRAU

I tentativi finora fatti per ottenere la immunizzazione artificiale contro l'infezione tifosa nei più diversi animali, non si può dire che abbiano raggiunto lo scopo.

Si sono adoperati colture virulente, colture morte, filtrati di colture vive e morte, estratti di colture in toto, estratti del corpo batterico, sieri ottenuti con l'inoculazione in animali di tutti questi diversi materiali, con dei risultati che, ove a questo, ove a quello esperimentatore sono apparsi decisivi o addirittura da non tenersi in conto.

I.

Stando così le cose io son voluto tornare su questo genere di ricerche, perchè mi pareva occorresse prima studiare più profondamente la quistione della produzione di una tossina solubile da parte del bacillo di Eberth (tossina sulla quale avevano richiamata l'attenzione il Bandi, il Rodet, lo Chantemesse, i Werner, Rodet, Lagriffoul e Walhy, il Moreschi, il Bayle, il Lenz, il Lange) e assodatane l'esistenza procedere preferibilmente con essa a tentativi di immunizzazione negli animali.

Allo scopo, dico subito che ho coltivato il batterio del tifo da un canto nei comuni terreni e dall'altro l'ho seminato in terreni di coltura i quali si avvicinassero più che fosse possibile a quello che è costituito dall'essudato

endoperitoneale delle cavie, nel quale pare accertata la produzione di una vera tossina.

Per le colture nei terreni di nutrizione liquidi, poichè Rodet, Lagriffoul e Walby, i quali avevano ricorso all' ordinario brodo di carne di bue, avevano precisato le condizioni in cui bisognava porsi per ottenere le colture con maggior rendimento di tossicità, ho creduto opportuno di attenermi alle norme indicate dagli autori. Solo ho aggiunto alcuni controlli tenendo brodocolture in termostato per un tempo maggiore di quello prescritto da essi, e poichè sostituendo la carne di cavallo e quello di bue non si modificavano i risultati dell' esperimento, così ho usato brodo di carne di cavallo invece di brodo di carne di bue.

Inoltre ho creduto opportuno di ridurre la quantità di peptone all' 1 $^{0}/_{0}$ (gli autori adoperavano il 2 $^{0}/_{0}$,) anche nella considerazione che nella tossicità delle colture potesse avere influenza una qualsivoglia modificazione del peptone aggiuntovi.

Dopo di che ecco in dettaglio la tecnica esiguita: 500 gr. di carne di cavallo si maceravano in 1000 cc. di acqua ; il liquido filtrato, bollito, aggiunto di gr. 0,5 di Na Cl con 1 $^{0}|_{0}$ di peptone, debitamente alcalinizzato con carbonato sodico, veniva accuratamente sterilizzato, dopo la necessaria ribollitura e filtrazione, entro Erlenmeyer della capacità da 300 a 1000 cc. nei quali veniva versato in modo da occupare non più di cm. 1,5 in altezza dal fondo del recipiente. In questi brodi la semina veniva fatta con l'ansa di platino intrisa in patina sviluppatasi su agar a becco di clarino tenuta per 48 ore nel termostato a 37°. Dopo la semina venivano posti anche essi a 37° da dove si toglievano trascorsi i tre giorni. Solo in alcuni casi, come ho detto, furono lasciati sette , quindici e più giorni.

In genere lo sviluppo negli Erlenmeyer si osservava già al termine delle 12 ore; però, quando il recipiente era molto grande si ebbe a notare un notevole ritardo nello sviluppo, anzi non poche volte fu necessario ripetere l' innesto al termine delle 48 ore. In questi casi volendo tener conto della data della prima semina i palloni finirono per rimanere nell' incubatrice cinque giorni.

Quanto alle colture in terreni che ripetessero quanto più fosse possibile le condizioni nelle quali entro l' organismo il bacillo è stato dimostrato che segrega la sua tos-

sina, cioè, tenendo presente il fatto che la tossina tifica è stata trovata nell' essudato peritoneale delle cavie inoculate, mi sono servito di un terreno di nutrizione nel quale il Casagrandi ha trovato diversi batteri, capaci di produrre veleni, cioè di essudato sterile ottenuto coll' inoculazione di aleuronato nel cavo pleurico dei conigli.

Il materiale aspirato con tutte le regole per evitare inquinamenti, distribuito in provette sterili e a seconda della quantità in due o più, era subito semenzato con varie ansate di bacillo del tifo proveniente da colture in agar a becco di clarino di 48 ore di età. I tubi venivano poi collocati nel termostato a 37° e lasciativi per un tempo variabile da tre a trenta giorni.

Naturalmente queste prove le ò fatte precedere da altre per vedere se il bacillo si sviluppasse in questo particolare substrato, ed ò continuato le ricerche dopo che ne ò avuto l'assoluta certezza; dirò anzi che lo sviluppo è rigoglioso, che esso è già abbastanza notevole al termine di 24 ore.

Il materiale colturale naturalmente si solidifica, ma rimane sempre uno strato liquido sovrastante che si estende anche tra il coagulo e le pareti del tubo. In questo liquido si sviluppa rigogliosamente il bacillo di Eberth, ed a lungo andare si nota che il coagulo va riducendosi ed il liquido si intorbida.

Premessi tutti questi dati sui terreni di coltura adoperati, riferisco ora i procedimenti eseguiti per cercare le eventuali proprietà tossiche del batterio nei substrati stessi.

A tale scopo ho sottoposte le brodocolture a filtrazione attraverso a grandi candele Berkefeld W aiutandomi col fare, nel recipiente di raccolta del liquido, un vuoto rispondente a 1 atmosfera.

Il filtrato veniva poi concentrato a bagno maria a 40°-45° in recipiente in cui veniva fatto il vuoto.

Per la ricerca di proprietà tossiche nelle colture in essudato, essendo il materiale in parte solidificato, si triturò insieme a quarzo sterile in mortaio di porcellana e si diluì il materiale con una certa quantità di soluzione fisiologica di cloruro sodico e quindi lo si filtrò nello stesso modo indicato di sopra per le brodocolture. Il filtrato ottenuto non venne mai concentrato.

II.

Premetto che alcuni esperimenti fatti inoculando nelle cavie i filtrati di brodocolture senza concentrarli, (in quantità di 5 cmc.) non mi condussero a trovare in essi alcuna azione tossica e che viceversa gli stessi concentrati al decimo, si mostrarono dotati di tale azione, e tanto più intensa quanto più le colture erano recenti, ma bene sviluppate.

Infatti, le cavie inoculate coi filtrati di colture di 10-15 giorni, morirono dopo 6-8 ore dall'inoculazione subita. All'autopsia si notò abbondante il liquido endoperitoneale rossiccio con fiocchi di fibrina, il peritoneo iperemico, arrossate le capsule surrenali e congesto il fegato e la milza. Invece le cavie inoculate coi filtrati di 3 giorni, concentrati, mantenendo la stessa dose per la inoculazione, uccisero le cavie in un tempo assai più breve, persino in due ore.

Dopo di ciò non rimaneva che stabilire la tossicità delle brodoculture stesse filtrate e concentrate in rapporto al peso dell'animale.

Le colture di tre giorni in brodo di carne di cavallo filtrate, vennero concentrate al decimo ed inoculate in cavie nelle rispettive dosi di cc. 0, 1 — 0, 3 — 0, 4 — 0, 5 — 1 — 1, 5 — 2 per cento del peso dell'animale. Sopravvissero le sole cavie inoculate con cc. 0, 1 — 0, 3.
Le altre morirono in questo ordine:

Cavia	inoculato	2 o[o	di filtrato	muore	dopo	3 ore
»	»	1, 5	»	»	»	6 »
»	»	1	»	»	»	12 »
»	»	0, 5	»	»	»	24 »
»	»	0, 4	»	»	»	28 »

Ritenni quindi che la dose minima mortale del filtrato concentrato fosse di cc. 0, 4. per 100 gr. d'animale

Stabilita la tossicità delle brodocolture passai a considerare quella dei filtrati delle colture in essudato. Come ò già riferito nella parte tecnica, queste colture non vennero

concentrate, anzi diluite con circa il doppio di soluzione fisiologica.

Con filtrati di colture di non più di sette giorni furono inoculate 4 cavie con quantitá variabile di filtrato da cc. 5 a cc. 12. Esse morirono tutte, al più presto 12 ore dopo l' inoculazione, al più tardi dopo due giorni, presentando il solito quadro anatomo-patologico nel quale spiccava particolarmente l' iperemia delle ghiandole surrenali. Le restanti cavie furono inoculate con filtrati di colture di maggiore età, nessuno di questi animali morì.

In base ai risultati di queste ricerche si può quindi concludere che nelle colture in essudato si producono sostanze tossiche che passano nei filtrati e si mettono in evidenza senza concentrarle, anzi sono ancora dimostrabili se alquanto diluite: però scompaiono al di là della prima settimana di coltura.

III.

Così assodata l' esistenza di un veleno nelle colture del bacillo di Eberth, bisognava precisarne i caratteri per vedere se potesse collocarsi nel gruppo delle tossine propriamente dette.

Anzitutto occorreva vedere se la sua azione si manifestasse anche inoculandolo per altre vie. A tal uopo l' ò introdotto nelle cavie per le vene e sottocute.

Iniettandolo sottocute si forma edema diffuso, denso, giallastro, le carni sono arrossate e si notano delle piccole emorragie; il sistema ganglionare arrossato; lè cavità contengono un liquido sieroso; le capsule surrenali sono iperemiche e le Placche del Peyer ingorgate.

Inoculandolo nelle vene, l'animale appena rifattosi dall'inoculazione mostra segni di malessere e finisce col morire in circa sei ore, con un quadro anatomo - patologico in cui spicca nettamente la degenerazione grassa del fegato e del rene nonchè la iperemia delle capsule surrenali.

Assodati questi fatti ò ricercata la resistenza del veleno di fronte agli agenti fisici e chimici.

A tal uopo essendo noto che le tossine ànno una debole resistenza al calore, sciolte in acqua, e una relativa-

mente alta resistenza, essicate, ò sottoposto il filtrato da un canto all'azione delle temperature da 45° a 60° e lo stesso, ridotto a secchezza, alla temperatura di 130° e 140°: la durata dell'esposizione a queste temperature è variata a seconda dei casi da mezz'ora a molte ore. Il filtrato dopo essere stato esposto all'azione del calore veniva poi inoculato nel peritoneo di cavie in quantità, nelle condizioni ordinarie, più volte mortale.

Le ricerche sono le seguenti:

la tossina tenuta a	45°	per 15 ore	sciolta	si	inattiva
»	»	50°	» 8 »	»	»	»
»	»	58°	» 2 »	»	»	»
»	»	130°	» 1/2 »	secca	»	»
»	»	140°	» 1/2 »	»	non si	inattiva

cioè la tossina sciolta, si inattiva sol che venga protratta per un numero d'ore rilevante l'azione della temperatura di 45°: a 58° bastano 2 ore. Secca, invece, neppure la temperatura di 130° protratta per mezz'ora la inattiva: occorre quella di 140°.

Passando poi a studiare il modo di agire della tossina dopo essere stata in contatto con quelle sostanze chimiche le quali annullano l'azione della tossina tetanica e difterica come l'acqua di calce, la potassa al 0, 3 0/0, il permanganato di potassa al 10 0/0, l'acido fenico all'1, 5 0/0, ho trovato che anche la tossina tifica viene inattivata del tutto. Le cavie inoculate anche con 5 cmc. dei concentrati di filtrati di brodocolture trattati con i reagenti ora elencati sopravvissero tutte.

Indubbiamente del resto la tossina tifica è molto labile: la precipitazione col solfato di ammonio e anche quella coll'alcool la inattivano del pari o almeno l'attenuano.

Riferisco il seguente esperimento che lo prova.

Precipitai con alcool 100 cmc. di filtrato di coltura di 3 giorni, filtrai il liquido e ciò che è rimasto sul filtro raccolsi con una spatola e posto in una capsula, ne favorì l'essicamento per mezzo del vuoto per breve tempo. Lo sciolsi poi in 10 cc di soluzione fisiologica sterile, e tutti

questi 10 cc si inocularono nel cavo peritoneale di una cavia la quale morí dopo sei giorni, non mostrando alcun fatto che fermasse l'attenzione, se ne togli una leggiera iperemia delle ghiandole surrenali.

D'altro canto contemporaneamente a questo esperimento venivano inoculati 10 cc di filtrato della stessa brodocoltura, concentrato al decimo, nel peritoneo di una cavia di 490 gr,, e l'animale moriva dopo poche ore dall'iniezione presentando il solido quadro che dànno i filtrati di brodocolture tifiche tossiche concentrate.

È adunque chiaro che l' alcool se non inattiva del tutto, almeno attenua di molto l'azione della tossina, osservazione del resto fatta dal Moreschi riguardo al veleno del bacillo tifico da lui studiato.

Anche i precipitati dei filtrati delle colture in essudato, ottenuti con l' alcool, si sono comportati analogamente. Ho inoculato nelle cavie la tossina precipitata da filtrati di colture di quattro giorni, di quindici giorni e di un mese: il precipitato delle colture di quattro giorni à ucciso la cavia in due giorni, quello di quindici giorni dopo sei giorni, e quella di un mese è rimasta senz' azione.

Benchè in questo caso sia evidente che la diversa tossicità dei precipitati è legata alla diversa età delle colture tuttavia è certo che quello della coltura di quattro giorni si è mostrato meno tossico del filtrato rispondente non precipitato che ha ucciso la cavia in 20 ore.

Del resto ò già detto in precedenza che le colture in essudato di otto giorni filtrate uccidono le cavie in 24 ore.

IV

Per potere però affermare che il veleno tifico da me studiato fosse una tipica tossina, era altresì necessario procedere ad altre ricerche e precisamente vedere se inoculandola negli animali fosse stato possibile di ottenere antitossine nel siero.

Intanto è certo che il filtrato delle brodocolture concentrato esplica un'azione vaccinante nelle cavie.

Queste esperienze valgano a dimostrarlo:

Cavia peso gr· 312, inoculata con cmc. 0,4 del filtrato

viene inoculata dopo 5 giorni con una coltura tifica in dose sicuramente mortale (uccide sicuramente una cavia di 420 gr.): muore.

Cavia peso gr. 360, inoculata con cmc. 0, 8 viene inoculata, dopo lo stesso tempo della precedente con la coltura, del pari alla stessa dose: sopravvive. Altra cavia del peso di 380 gr. inoculata con cmc. 1, 2 e poi con la coltura tifica, sopravvive.

Dove si vede che l' inoculazione endoperitoneale di dosi anche cinque volte più piccole della dose minima mortale riesce a salvare gli animali dall' inoculazione, successivamente praticata, di una coltura tifica certamente mortale.

Seguendo la via sottocutanea i risultati non sono però così confortanti come à notato anche il Paladino-Blandini. Possono però divenirlo con successive inoculazioni di veleno in dose crescente.

Mi fu facile infatti dimostrare che nelle cavie che sopportavano dosi via via crescenti di concentrato di filtrato delle brodoculture, si destavano delle proprietà immunizzanti contro l'infezione tifica.

Inoltre le cavie così immunizzate fornivano dei sieri che spiegavano una azione preventiva contro la inoculazione sottocutanea di una coltura tifica in dose sicuramente mortale, fatta in altra cavia (1).

Pensai allora, anche per aver maggiore materiale a mia disposizione, di immunizzare un grosso animale col veleno tifico e di servirmi per tutte le ricerche all'uopo necessarie del siero dell'animale stesso preparato.

Scelsi naturalmente un equino e precisamente un'asino che andai inoculando con filtrato concentrato in quantità da prima inferiore alla dose minima mortale per 100 gr. di cavia e poi successivamente con dosi sempre più crescenti, sino a raggiungere il doppio della dose minima mortale.

---

(1) Non riferisco in dettaglio questi esperimenti, parendomi superflui di fronte ai successivi, fatti con siero di asino.

L' animale col crescere della dose di tossina inoculata mostrò di reagire più intensamente alle inoculazioni del veleno tifico; si formarono anche degli ascessi nei punti di inoculazione sterili di batteri (fatto che è noto succedere all'inoculazione di molte tossine). Dopo ogni inoculazione la temperatura si elevò e diminuì il peso dell'animale.

Il 4 giugno, l'animale fu salassato dalla giugulare, usando tutte le cautele per evitare possibili inquinamenti e del siero separatosi per coagulazione a bassa temperatura fu studiato il potere antitossico, agglutinante e battericida da un lato, e dall'altro la sua azione preventiva e curativa verso l'intossicazione tifica sperimentale nelle carie.

Mescolai alla dose minima mortale per 100 gr. di cavia, quantità diverse di siero da cm.c 0,05 a 10. Le mescolanze appena fatte vennero inoculate nel cavo peritoneale di cavie. Ecco gli esperimenti:

Cavia	gr.	254	inoculata	con	cmc.	1	di tossina	e	cmc.	0,05	di siero:	muore
»	»	300	»	»	»	1.2	»	»	»	0,10	»	»
»	»	350	»	»	»	1 6	»	»	»	0,25	»	»
»	»	312	»	»	»	1.3	»	»	»	0,50	»	vive
»	»	325	»	»	»	1.4	»	»	»	1,00	»	»
»	»	322	»	»	»	1.4	»	»	»	5,00	»	»
»	»	292	»	»	»	1.2	»	»	»	10,00	»	»

E' chiaro dunque che cmc. 0, 50 di siero neutralizzarono l'azione della dose minima mortale di veleno tifico per 100 gr. di caria.

Questo stesso siero era dotato di un certo potere agglutinante: dopo 1 ora infatti a 37° si aveva la sieroreazione sino al rapporto di 1 a 1000.

Inoltre esso si mostrava dotato di un certo potere battericida. Nessuna colonia si sviluppò nelle piastre seminate con un decimo di mescolanza del siero con l' emulsione dei batteri mentre nel controllo se ne sviluppavano 47854 Lo stesso si dica dopo 36-48 ore.

Con questo siero, dotato delle proprietà ora descritte, furono eseguite le seguenti prove.

Una cavia del peso di gr. 342 fu inoculata nel peritoneo con cmc. 1 di siero. Dopo 10 ore fu inoculata con cmc. 1,4 di tossina. La cavia sopravvisse.

Tre cavie di diverso peso furono inoculate nel peritoneo con cc. 1 di siero, poi a distanza di qualche ora furono inoculati 4 cc. di brodocultura di bacillo del tifo: gli animali sopravvissero. Naturalmente fu fatta l'inoculazione della coltura anche in una cavia di controllo che morì dopo 10 ore.

Infine diverse cavie furono inoculate nel peritoneo con diverse quantità di siero, mentre precedentemente erano state inoculate parte con coltura tifica nel sottocutaneo, parte con tossina tifica nello stesso cavo peritoneale.

Dalle esperienze sinora fatte, risulterebbe che cc. 1 di siero inoculato nel peritoneo a cavie infettate per la via sottocutanea tre ore prima con colture tifiche sicuramente mortali, si salvarono, come si salvarono le cavie inoculate con cc. 0,5 di siero nel peritoneo, le quali quattro ore prima erano state iniettate con una dose mortale di tossina tifica.

CONCLUSIONI

1. Nelle colture nei terreni liquidi ordinari (brodi di carne di cavallo e di bue) il bacillo del tifo produce un veleno solubile, che si rende evidente concentrando al decimo nel vuoto a 45° i filtrati del tutto amicrobici delle brodocolture stesse.

2. Anche nelle colture in essudato sterile (ottenuto coll'inoculazione dell'aleuronato nel cavo pleurico dei conigli) (Casagrandi) si riesce ad ottenere un veleno che passa attraverso le candele porose e che à la stessa azione di quello delle brodocolture filtrate e concentrate.

3. Il veleno tifico uccide le cavie inoculato nelle vene nel sottocutaneo e nel peritoneo; in tutti i casi appare sem-

pre manifesta la iperemia delle capsule surrenali e l'ingorgo delle placche del Peyer: coll' inoculazione endovenosa si aggiunge degenerazione grassa acuta del fegato, coll'endoperitoneale peritonite siero-fibrinosa, con la sottocutanea edema.

4. Questo veleno per la sua debole resistenza, al calore (non resiste, sciolto, al di là di 58 gradi), per quella, essicato, assai elevata a temperature oltre i 100 gradi, per la sua inattivabilità per mezzo di quegli agenti chimici i quali inattivano le ordinarie tossine (potassa, calce, permanganato, acido fenico) ha i caratteri di una tipica tossina: si può però ritenere che la sua labilità sia maggiore di quella della tossina tetanica e difterica di fronte agli agenti fisici e chimici (l'alcool ed il solfato d' ammonio la precipitano attenuandola, l'ossigeno e il calore a 45 gradi per 15 ore l'inattivano.)

5. Si possono immunizzare le cavie con l' inoculazione di dosi via via crescenti di veleno tifico: lo stesso si dica degli equini.

6. Il siero degli animali immunizzati possiede proprietà antitossiche, agglutinanti, battericide ed ha un certo potere preventivo e curativo verso l' infezione e l' intossicazione tifica sperimentale delle cavie.